

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 16 MAR 2004

WIPO

PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen:

103 25 637.7

Anmeldetag:

06. Juni 2003

Anmelder/Inhaber:

Universität Leipzig, 04109 Leipzig/DE

Bezeichnung:

Verwendung des Gens $\beta 6$ und/oder $\beta 7$ der
 β -Untereinheit von hCG als Marker zur Im-
plantationsdiagnostik

IPC:

C 12 Q 1/68

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 3. Februar 2004
Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Faust

Verwendung des Gens $\beta 6$ und/oder $\beta 7$ der β -Untereinheit von hCG als Marker zur Implantationsdiagnostik



Die Erfindung betrifft die Verwendung eines Gens der β -Untereinheit von humanem Choriongonadotropin (hCG) als Marker für die Implantationsfähigkeit der Uterusschleimhaut (Endometrium) für einen Embryo.

Das der Erfindung zugrunde liegende hCG-Hormonmolekül ist ein Glykoprotein, bestehend aus zwei Untereinheiten α CG und β hCG in nichtkovalenter Bindung (1). Während der Schwangerschaft sezerniert der Trophoblast größere Mengen hCG-Dimer und freie α CG- und β hCG-Moleküle in das Blut. Auch in einigen nicht-trophoblastären Geweben gesunder Menschen wird hCG und/oder seine Untereinheiten in geringen Mengen exprimiert (2-6). Deshalb können im Serum hCG-Konzentrationen von hCG bis 1000 pg/ml und von β hCG bis 100 pg/ml in nichtschwangeren gesunden Personen beobachtet werden (7, 8). Höhere β hCG-Serumwerte deuten auf einen gonadalen oder nicht-gonadalen Tumor hin und kennzeichnen eine ungünstige Prognose, wie bei Lungen-, Blasen-, Prostata-, Colon-, Nierenzell- und Mammakarzinom beschrieben (5, 9-13). Während das β CG-Molekül nach bisherigem Kenntnisstand durch ein einziges Gen auf dem Chromosom 6q21.1-q23 codiert wird, wird β hCG durch sechs nicht-allele Gene: β hCG 8 ($\beta 8$), $\beta 7$, $\beta 5$, $\beta 3$, $\beta 1$ und $\beta 2$ als einem Gencluster auf dem Chromosom 19q13.3 codiert. Ein weiteres β hCG-Gen $\beta 6$ ist ein Allel von $\beta 7$ mit Differenzen in der 5'-nichttranslatierten Sequenz des Promotorgens (Exon 1 des β hCG). Nur die Gene $\beta 8$, $\beta 7$, $\beta 6$, $\beta 5$ und $\beta 3$ codieren ein β hCG-Proteinmolekül von 145 Aminosäuren (Exon 2 und Exon 3).

Während $\beta 5$, $\beta 8$ und $\beta 3$ an Position 117 (Exon 3) der Aminosäuresequenz das Aspartat (Asp, A) codiert, bildet $\beta 7$ und $\beta 6$ dort Alanin (Ala, D). Die Gene $\beta 1$ und $\beta 2$ können zwar auch in einigen Geweben transkribiert werden, codieren aber ein Protein von nur 132 Aminosäuren mit unterschiedlicher Sequenz zum β hCG (14-16).

Während im Trophoblast fast ausschließlich hCG $\beta 5$, $\beta 8$ und $\beta 3$ exprimiert und translatiert wird, wird in einigen normalen, nicht-trophoblastären Geweben (Mamma, Lunge, Prostata, Skelettmuskulatur, Blase, Colon, Uterus u. a.) nur hCG $\beta 7$ und $\beta 6$ in geringem Umfang translatiert (17). Andererseits scheint im neoplastischen Trophoblast

2

(Chorioncarcinom) verstärkt hCG $\beta 7$, $\beta 6$ und in einigen neoplastischen nicht-trophoblastären Geweben zusätzlich hCG $\beta 5$, $\beta 8$ und $\beta 3$ exprimiert zu werden.

In der Vergangenheit sind verschiedene Studien mit dem Ziel durchgeführt worden, die β hCG-Transkripte in verschiedenen normalen und neoplastischen Geweben nicht-trophoblastärer Herkunft mit semiquantitativer Methode nachzuweisen (5, 11, 12, 18). Diese Methoden zeigen, daß $\beta 7$, $\beta 5$, $\beta 8$ und $\beta 3$ in normaler Plazenta (19), gesunden Testes (6), aber auch neoplastischen Testes (20) und neoplastischem Blasengewebe (21) transkribiert, aber in den verschiedenen Studien aber zwischen $\beta 7$ sowie $\beta 5$, $\beta 8$, $\beta 3$ nicht unterschieden wird.

In einer Arbeit (9) wird die Anwesenheit von $\beta 7$ im normalen und von $\beta 8$, $\beta 5$, $\beta 3$ in malignem Blasengewebe durch spezifische Restriktionsenzyme für die Erkennung einzelner Transkripte nachgewiesen:

Eine weitere Arbeit bestimmt die Überexpression von $\beta 5$, $\beta 8$, $\beta 3$ im maligne transformierten nicht-trophoblastären Gewebe durch den ermittelten Transformationsindex, bestehend im Verhältnis zwischen der Expression von Gen $\beta 5$, $\beta 8$, $\beta 3$ zur Gesamtexpression aller β hCG-Gene im selben Gewebe. Er wird mit Primern zwischen Exon 2 und Exon 3 erfaßt, die die Punktmutation C117 in der C-terminalen Region des β hCG im Exon 3 erkennen (17). Bisher wird diese Punktmutation Asp - Ala in Position 117 der β hCG-Aminosäureketten im genannten Quotient als diagnostischer Parameter der neoplastischen Transformationen genutzt.

Eine Tumorentifizierung durch Analyse der Sekretionsprodukte, insbesondere der Nutzung des hCG als Indikator für eine Krebserkrankung, zeigt eine französische Arbeitsgruppe bereits 1996. Beschrieben wird von Bellet et al. (17), daß die β -Untereinheit von hCG durch vier nicht-allele β hCG-Gene codiert wird. Zu den wesentlichen Erkenntnissen gehört, daß die maligne Transformation nicht-trophoblastären Gewebes stets mit der Expression von β hCG-Genen verbunden ist, die im Trophoblast normal transkribiert werden. Die Erforschung der β hCG-Gene, die durch nicht-trophoblastäres Gewebe exprimiert werden, führt zu dem Ergebnis: normales nicht-trophoblastäres Gewebe exprimiert nur β hCG-Gene vom Typ I (hCG $\beta 7$, $\beta 6$), während nach maligner

Transformation auch β hCG-Gene vom Typ II (hCG β 5, β 8, β 3) exprimiert wird. Der dazu verwendete CG117-Assay ist empfindlich genug, spezifisch eine auch nur geringe Menge vom β hCG-Transkript des Typs II zu erkennen, wodurch es möglich ist, Tumorgewebe im Umfeld von normalem Gewebe zu identifizieren.

In US-PS 6,194,154 wird ein Verfahren zur Bestimmung der malignen Transformation humaner Zellen beschrieben, das die Überexpression von β 3, β 5, β 8 und β 9-mRNA, welche die hCG- β -Kette codieren, mit deren Expression von β 7, β 6 in nicht-malignen Zellen vergleicht. Bestimmt wird auch die Steigerung der mRNA-Expression von β 3, β 5, β 8 und β 9-Genen im Verhältnis zur Gesamt- β -Genexpression in den malignen Zellen. Weiterhin wird ausgeführt, daß die Punktmutation in der mRNA-Nukleotidsequenz von Position 775 für β 5, β 8, β 3 ein A und für β 7, β 6 ein C anzeigt und in der Aminosäureposition 117 somit Aspartat (Asp, D) oder Alanin (Ala, A) codiert. Auf dieser Basis baut sich ein Testkit auf, der Verbreitung gefunden hat.

WO 0190344 nimmt Bezug auf den Promotor, Enhancer und andere Regulatoren, die die Expression des Proteins β hCG im testikulären Karzinom kontrollieren. Weiterhin erfolgen Ausführungen zur Gentherapie unter Einschleusung von Promotorgen- β hCG-DNA in verschiedene Zellen, z.B. in Liposomen. Das β hCG-Protein wird in verschiedenen Tumorgeweben als diagnostischer Parameter verwendet.

Die Recherchen zeigen die intensive Forschung über das humane Choriongonadotropin und die Differenzierung seiner β -Untereinheiten in Gensequenzen, denen unterschiedliche Eigenschaften zugeschrieben werden. Bisher sind die Gene β 6 und β 7 zur Implantationsdiagnostik nicht eingesetzt worden.

Unter Implantationsdiagnostik wird das Erkennen der Möglichkeit verstanden, daß für eine befruchtete Eizelle in der Uterusschleimhaut die Voraussetzung besteht, sich einzubetten und dort nachfolgend zu wachsen.

Die Erfindung hat das Ziel, ein Verfahren zur Implantationsdiagnostik anzugeben, das zuverlässig arbeitet, die Patientin nur gering belastet und einfach und schnell in seiner Durchführung ist.

Der Erfindung liegt die wissenschaftliche Erkenntnis zugrunde, daß ein zuverlässiger Indikator für eine mögliche erfolgreiche Implantation die Bewertung des Anteils der exprimierten 5'-nichttranslatierenden Promotorsequenzen des β hCG (Exon 1) von β hCG-Gen $\beta 7$, $\beta 6$ absolut oder relativ zu $\beta 5$, $\beta 8$, $\beta 3$ darstellt.

Die Gene hCG $\beta 7$ und $\beta 6$ des Genclusters werden hauptsächlich im normalen sekretorischen Epithelium der Uterusschleimhaut exprimiert. Die Gene hCG $\beta 5$, $\beta 8$, $\beta 3$ des Genclusters werden im normalen Trophoblast und im karzinom-transformierten Epithelium exprimiert. Lymphozyten (CD3) und Monozyten (CD14) exprimieren bei Normalpersonen hCG $\beta 7$ und $\beta 6$.

Zur Implantationsdiagnostik ist die Bestimmung von hCG $\beta 6$ und des allelen Gens $\beta 7$ erforderlich. Es wurde erkannt, daß deren Gehalt im körpereigenen epithelialen Gewebe oder Blutzellen den Erfolg einer Implantation wesentlich bestimmt, und daß deshalb die Kenntnis der Menge an hCG $\beta 7$ und $\beta 6$ absolut oder relativ betrachtet in Kenntnis des Quotienten aus hCG $\beta 7$, $\beta 6$ als Zähler und hCG $\beta 5$, $\beta 8$, $\beta 3$ als Nenner Aufschluß über den erfolversprechenden Implantationsmoment gibt.

Zur Bestimmung des hCG $\beta 7$, $\beta 6$ - und des hCG $\beta 5$, $\beta 8$, $\beta 3$ -Anteils ist die quantitative RT-PCR geeignet.

Bei den Forschungsarbeiten wurde überraschenderweise gefunden, daß das Gen β wie das allele Gen $\beta 7$ nicht vollständig mit dem Gen übereinstimmen, das im Endometrium gebildet wird und von uns die Bezeichnung Gen $\beta 6e$ erhält. Sein Aufbau ist von uns in SEQ ID NO 7 als Sequenz Endo beschrieben.

Dieses Gen $\beta 6e$ (Endometrium) spielt eine wichtige Rolle in der Implantationsdiagnostik und wird deshalb hier angegeben.

Die Erfindung bezieht sich deshalb auch auf das Gen $\beta 6e$ als solches und seine Verwendung als Implantationsindikator.

Dazu werden 4 bis 6 Tage nach der Ovulation Zellen mit einem Minikatheter aus der Gebärmutterhöhle, mit einem Wattebausch aus der Zervix oder mit einem Holzspatel

von der Mundschleimhaut gewonnen bzw. peripheres EDTA- bzw. Heparinblut entnommen. Aus den aufgenommenen Zellen wird die mRNA von ehCG isoliert, die cDNA amplifiziert und im RT-PCR-Prozeß quantitativ bestimmt.

Ein Nachweis der mRNA von ehCG zeigt an, daß sich das Endometrium in Richtung einer Implantationsreife differenziert.

Die Erfindung wird durchgeführt, wie in Anspruch 1 bis 7 beschrieben.

Die Erfindung wird nachstehend in Ausführungsbeispielen näher erläutert, ohne auf diese beschränkt zu sein.

Ausführungsbeispiel 1

Der Patientin werden zur Diagnostik Zellen mit einem Minikatheter aus der Gebärmutterhöhle oder mit einem Wattebausch aus der Zervix oder mit einem Holzspatel von der Mundschleimhaut entnommen. Die Zellen werden bis zur Weiterverarbeitung sofort bei minus 80° C eingefroren und gelagert. Zur Analyse wird aus den aufgenommenen Zellen eine Trizol-RNA-Extraktion durchgeführt, die cDNA des endometrialen hCG (ehCG) im nachfolgenden RT-PCR-Prozeß spezifisch amplifiziert und quantitativ erfaßt.

Es kann davon ausgegangen werden, daß die Anwesenheit von hCG $\beta 7$, $\beta 86$ und $\beta 6e$ ein Indikator für die optimale Implantation darstellt. Das Fehlen von hCG $\beta 7$, $\beta 6$ und $\beta 6e$ zeigt das Gegenteil an: eine mögliche Implantation kann in diesem menstruellen Zyklus ausgeschlossen werden. Von besonderer Bedeutung ist der Fakt, daß mit der β hCG-Diagnostik fehlendes oder hochaufgebautes sekretorisches Endometrium erkannt werden kann, so daß die Diagnose auch einen Therapiehinweis gibt. Zu beachten ist, daß hCG $\beta 6$ und $\beta 6e$ im wesentlichen durch hCG $\beta 7$ repräsentiert wird (vier Nukleotiddifferenzen im Exon 1). Andererseits kann der Nachweis von erhöhtem hCG $\beta 5$, $\beta 8$, und $\beta 3$ im endometrialen Gewebe oder deren Zellen einen Hinweis auf eine Tumorerkrankung darstellen. Die Gewebeproben können auch analog nach der Methode der fraktionierten Abrasio gewonnen werden.

Endometriales Gewebe oder Zellen dieser Herkunft (10 - 100 mg) werden sofort nach Entnahme in Flüssigstickstoff oder bei -80°C eingefroren. Für die Untersuchung der drei exprimierten Anteile hCG $\beta 7$, $\beta 6$ und $\beta 6e$ sowie hCG $\beta 8$, $\beta 5$, $\beta 3$ und Gesamt- β hCG wird die Total-RNA mit Trizol extrahiert und etwa $1\text{ }\mu\text{g}$ der RNA für 60 min bei 42°C unter Standardbedingungen und Einsatz von Oligo-dT(15)-Primer reverse-transkribiert.

Nutzung von Methoden: Gewebeentnahme zur Diagnostik, Lagerung in Flüssigstickstoff, RNA-Extraktion (23), RT-PCR mit fluoreszenzmarkiertem Primerpaar, Erfassung der Gesamt- β hCG-Expression $\beta 5$, $\beta 8$, $\beta 3$ und $\beta 7$, $\beta 6$ und $\beta 6e$ über Exon1, Exon 2 und Exon 3, nested PCR mit unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Primern jeweils für den $\beta 7$, $\beta 6$, $\beta 6e$ - und eventuell $\beta 5$, $\beta 8$, $\beta 3$ -Anteil; quantitative Auswertung als Quotient von $\beta 7$, $\beta 6$, $\beta 6e$ -Anteil zum Gesamt-hCG-Anteil $\beta 7$, $\beta 6$ - plus $\beta 5$, $\beta 8$, $\beta 3$ -Anteil für die Bewertung des hochaufgebauten sekretorischen endometrialen Gewebes, Ergebnis 1 bei Normalgewebe und Ergebnis > 0 bis 1 unterwertigem oder fehlenden sekretorisch transformierten Gewebes im Ausführungsbeispiel 1; absolute quantitative Auswertung der exprimierten Kopienzahlen für die genspezifischen β hCG-Amplifikate $\beta 7$, $\beta 6$, $\beta 6e$ und Gesamt- β hCG nach Real time-RT-PCR im Vergleich zu β hCG-sequenzspezifischen Kalibratoren bei nicht-fluoreszenzmarkierten Primern für die Bewertung des normalen und neoplastischen Gewebes im Ausführungsbeispiel 2.

Nutzung von Geräten und Material: Gewebe in Flüssigstickstoff, Ultra Turrax-Gewebehomogenisation, Trizol-RNA-Extraktion, RT-PCR am Thermocycler, Fluoreszenzmessung des cDNA-Amplifikates am DNA Sequencer ABI 373A, Software Genescan 672 Fragment Analysis zur Auswertung, Flüssigstickstoff, Trizol, cDNA-Synthese-Kit, PCR-Amplifikationskit, β hCG-Primer für Gesamt- β hCG-Amplifikation und nested PCR für $\beta 7$, $\beta 6$, $\beta 6e$ und $\beta 5$, $\beta 8$, $\beta 3$ zum Teil fluoreszenzmarkiert.

Beschreibung der Methode für Ausführungsbeispiel 1:

Extraktion der Gesamt-RNA: Das frische Gewebematerial wird sofort nach der Entnahme in Flüssigstickstoff eingefroren. Die Gesamt-RNA wird mit der Methode nach Chomczynski und Sacchi (24) extrahiert, die gewonnene RNA spektrophotometrisch bei 260 nm / 280 nm quantifiziert, sofort weiterbearbeitet oder bei -80°C gelagert.

Auswahl der Oligonukleotidprimer: Die in der Abb. 1 aufgeführten Oligonukleotidprimer wurden derart ausgewählt, daß sie unter Verwendung der Gesamt-RNA und der RT-PCR Methode in einem ersten Amplifikationsschritt die gesamten β hCG Transkripte β 5, β 8, β 3 und auch β 7, β 6 in gleicher Effizienz darstellen. Die gewählten Primer 1 und Primer 2 schließen die β LH-Amplifikation wegen eines differenten Nukleotid-Triplets aus. Im folgenden nested PCR-Schritt wird unter Verwendung Primer 4 und Primer 2 das Transkript β 7, β 6, β 6e und eventuell mit Primer 3 und Primer 2 das Transkript β 5, β 8, β 3 amplifiziert.

Reverse-Transkription: 1 μ g Gesamt-RNA wird in einem Reaktionsmix mit dem Totalvolumen von 5 μ l nach der Standardmethode transkribiert: 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 1mM jedes dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 200 ng Oligo dT-Primer pdT15, 12,5 U RNase Inhibitor, 2,5 U AMV-Revertase. Inkubation des Reaktionsgemisches für 10 min bei 25 °C (Hybridisierung des Primers), 30 min bei 42 °C (Reversetranskription) und 5 min bei 95 °C (Denaturierung der Revertase und des RNase-Inhibitors) sowie Abkühlen auf 4 °C.

PCR-Amplifikation der gesamten β hCG-Transkripte: Zum cDNA-Produkt wird im selben Tube der PCR-Mix von 20 μ l im Gesamtvolumen von 25 μ l für die Amplifikation des Gesamt- β hCG-Transkriptes zugegeben: Endkonzentration von 10 mM Tris-HCl mit pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM $MgCl_2$, 200 μ M dNTP, 5 pmol Primer 1, 5 pmol Primer 2 und 2,5 U Taq-DNA-Polymerase. Die Amplifikationsbedingungen sind nach vorheriger 3 min-Inkubation bei 95 °C dann 30 sec 95 °C, 30 sec 65 °C, 60 sec 72 °C, für 35 Zyklen mit abschließenden 7 min bei 72 °C und schnellem Abkühlen auf 4 °C.

Nested PCR nach der COP-Methode für β hCG β 7, β 6- und β 5, β 8, β 3-Transkripte: 2 μ l des 1:10.000 verdünnten PCR-Produktes werden zu einem Gesamtvolumen von 20 μ l in ein PCR-Mix mit dem Endvolumen von 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 10 mM KCl, 3 mM $MgCl_2$, 50 μ M dNTP, 0,1 pmol Primer 2, 0,1 pmol Primer 3, 0,1 pmol des Primers 4 und 2 U Stoffel-Fragment Taq DNA Polymerase zugefügt. Die COP-Reaktion wird über 5 Zyklen am Thermocycler für je 30 sec bei 95 °C und 30 sec bei 65 °C durchgeführt.

Das erhaltene Produkt enthält die zwei Amplifikationsprodukte für β hCG β 7, β 6, β 6e und eventuell von hCG β 5, β 8, β 3 mit je einem differenten Fluoreszenzmarker für Pri-

mer 4 und Primer 3, und beide Transkripte enthalten zusätzlich einen dritten gemeinsamen Fluoreszenzmarker des Primers 2.

Für die Analyse am DNA Sequenzer (Perkin-Elmer Modell 373A) werden 2,5 µl des Produktes mit 2 µl Loading buffer und 0,5 µl Genescan Size Marker und der Elpho bei 8 % Acrylamid, 6 M Harnstoff und TBE-Puffer für 1 Stunde unterzogen. Die Ergebnisse werden mit der GeneScan 672 Software (Perkin-Elmer) analysiert unter Verwendung der ermittelten Fluoreszenzen für Gesamt-βhCG-Transkripte und den β7, β6, β6e- sowie eventuell den β5, β8, β3-Fragmenten.

Der Transkriptionsindex wird, wie bei Bellet et al. (17) beschrieben nach dieser Methode errechnet.

Ausführungsbeispiel 2

In diesem Ausführungsbeispiel wird die absolute quantitative Auswertung der exprimierten Kopienzahlen für die genspezifischen βhCG-Amplifikate β7, β6, β6e und eventuell βhCG β5, β8, β3 nach Real time-RT-PCR im Vergleich zu βhCG-spezifischen Kalibratoren bei nicht-fluoreszenzmarkierten βhCG-Primern für die Bewertung des normalen hochaufgebauten oder unterwertigen oder fehlenden sekretorisch transformierten endometrialen Gewebes dargestellt.

Zur quantitativen Bestimmung der drei obengenannten βhCG-Expressionsanteile wird die Real time-PCR am Light Cycler (Roche) oder vergleichbaren Geräten anderer Firmen für die Amplifikation der Tumor-cDNA eingesetzt. Für die Synthese der RNA-Standards der drei βhCG-Expressionsanteile β7, β6, β6e sowie eventuell β5, β8, β3 und das Gesamt-βhCG werden die drei Kalibrationsfragmente unter Standard-PCR-Bedingungen aus Tumor-cDNA amplifiziert. Dafür werden wieder die drei genannten, jetzt unmarkierten βhCG Typ II-, βhCG Typ I- und Gesamt-βhCG-spezifischen forward-βhCG-Primer (Primer 1, 3 und 4) mit dem gemeinsamen reverse-βhCG-Primer (Primer 2) benutzt. Die erhaltenen PCR-Produkte werden im Plasmid-Vector pGEM-T geklont. Unter Verwendung der T7- und Sp6-Promotoren der pGEM-T-Vectors dient das Plas-

mid als Template für die in vitro-Bildung von RNA entsprechend des Herstellerprotokolls. Die gebildeten Standard-RNA werden gereinigt und seine Konzentration vermessen.

Die Real time-PCR-Amplifikation am Light Cycler (Roche) bestimmt die Anzahl der gebildeter Genkopien für die zwei genspezifischen β hCG-Expressionsgruppen Typ II (β 8, β 5, β 3) und Typ I (β 7, β 6) sowie Gesamt- β hCG im endometrialen Gewebe und in den RNA-Standards. Die PCR-Reaktion erfolgt im 20 μ l-Reaktionsvolumen in den Endkonzentrationen von 1 x PCR-Puffer von 50 mM Tris-HCl (pH 8,3), 200 μ M dNTPs, mit 0,5 μ M der jeweils spezifischen forward- und reverse- β hCG-Primer, 4-5 mM $MgCl_2$, 0,5 U Taq Polymerase, SYBR Green I mit 1:3000 der Stammlösung (Molecular Probes) und 1 μ l der Templates (Endometrium-cDNA oder Standards bekannter Konzentration).

Die Erfindung beansprucht auch die Real time-Messung als one tube-RT-PCR oder die Verwendung anderer Methoden zur quantitativen Erfassung der Expression von spezifischer Genkopien neben SYBR Green I, wie zum Beispiel der Einsatz von genspezifischen Oligonukleotiden als Hybridisierungsproben mit unterschiedlichen Farbstoff- oder Fluoreszenzmarker-Anbindung (TaqMan, FRET, Beacon).

Patentansprüche:

1. Verwendung *des Gens* $\beta 7$ und/oder $\beta 6$ der β -Untereinheit von humanem Choriongonadotropin entsprechend SEQ ID No 5 und SEQ ID No 6 als Marker zur Implantationsdiagnostik.
2. Verwendung *der Gensequenz* SEQ ID No 5 und SEQ ID No 6 als Marker zur Bestimmung eines günstigen Zeitpunktes für die Implantation einer befruchteten Eizelle in die Schleimhaut des Uterus durch Feststellen des Gehaltes an hCG $\beta 7$, $\beta 6$ und hCG $\beta 5$, $\beta 8$, $\beta 3$ mit der Methode der quantitativen RT-PCR.
3. Verwendung *der Primersequenz* von SEQ ID No 4 und 3 oder sequenzversetzt als Marker zur Erfassung des Genclusters hCG $\beta 7$, $\beta 6$ oder des Genclusters hCG $\beta 5$, $\beta 8$, $\beta 3$ sowie *der Primersequenz* von SEQ ID No 1 und 2 oder sequenzversetzt zur Erfassung der gesamten β hCG-Genexpression in Gewebe- und Blutzellen für die Feststellung des Gehaltes an hCG $\beta 7$, $\beta 6$ -mRNA absolut und/oder durch Bildung des Quotienten von hCG $\beta 7$, $\beta 6$ zu hCG $\beta 5$, $\beta 8$, $\beta 3$ oder zu hCG β gesamt mittels quantitativer RT-PCR.
4. Bestimmung der Implantationsreife der Uterusschleimhaut für einen Embryo durch Messung der hCG $\beta 7$, $\beta 6$ -mRNA-Genexpression im Blut und Gewebe mittels quantitativer RT-PCR absolut oder als dem Quotient aus hCG $\beta 7$, $\beta 6$ zu β hCG gesamt oder hCG $\beta 5$, $\beta 8$, $\beta 3$.
5. Gen $\beta 6e$ der β -Untereinheit von humanem Choriongonadotropin entsprechend SEQ ID No 7, Endo.
6. Verwendung des Gen $\beta 6e$ der β -Untereinheit von hCG entsprechend SEQ ID No 7, Endo als Marker zur Implantationsdiagnostik.

7. Verwendung des Gen 6e der Untereinheit von hCG entsprechend SEQ ID No 7 und der Primer nach SEQ ID. No 1 bis 4 oder sequenzversetzt zur Bestimmung der Implantationsreife der Uterusschleimhaut für einen Embryo durch Feststellen des Gehaltes der β hCG-mRNA-Genexpression $\beta 6$, $\beta 6e$, $\beta 7$ im Blut und Gewebe absolut und/oder dem Bilden des Quotienten aus den Cluster-Anteilen von hCG $\beta 6$ $\beta 6e$, $\beta 7$ zu hCG $\beta 5$, $\beta 8$, $\beta 3$ oder hCG β gesamt mittels quantitativer RT-PCR.

Zitierte Nicht-Patentliteratur:

- (1) J.C.Pierce, T.F.Parsons, *Annu.Rev.Biochem.*, **50** (1981) 465-495
- (2) P.A.Rothman, V.A.Chao, M.R. Taylor, R.W.Kuhn, R.B.Jaffe und R.N.Taylor, *Mol.Reprod.Dev.*, **33** (1992) 1-6
- (3) S.Dirnhofer, M.Hermann, A.Hittmair, R.Hoermann, K.Kapelari und P.Berger, *J.Clin.Endocrinol.Metab.*, **81** (1996) 4212-4217
- (4) Z.M.Lei, P.Toth, C.V.Rao und D.Pridham, *J.Clin.Endocrinol.Metab.*, **77** (1993) 863-972
- (5) T.Yokotani, T.Koizumi, R.Taniguchi, T.Nakagawa, T.Isobe, M.Yoshimura, N.Tsubota, K.Hasegawa, N.Ohsawa, S.Baba, H.Yasui und R.Nishimura, *Int.J.Cancer*, **71** (1997) 539-544
- (6) P.Berger, W.Kranewitter, S.Madersbacher, R.Gerth, S.Geley und S.Dirnhofer, *FEBS Lett.*, **343** (1994) 229-233
- (7) I.Marcilliac, F.Troalen, J.-M.Bidart, P.Ghillani, V.Ribrag, B.Escudier, B.Malassagne, J.P.Droz, C.Lhomme, P.Rougier, P.Duvillard, M.Prade, P.-M.Lugagne et al., *Cancer Res.*, **52** (1992) 3901-3907
- (8) H.Alftan, C.Haglund, J.Dabek und U.H.Stenman, *Clin.Chem.*, **38** (1992) 1981-1987
- (9) V.Lazar, S.G.Diez, A.Laurent, Y.Giovangrandi, F.Radvanyi, D.Chopin, J.M.Bidart, D.Bellet und M.Vidaut, *Cancer Res.*, **55** (1995) 3735-3738
- (10) P.N.Span, C.M.G.Thomas, J.J.Heuvel, R.R.Bosch, J.A.Schalken, L.Locht, E.J.B.M.Mensink und C.G.J.Sweep, *J.Endocrinol.*, **172** (2002) 489-495

- (11) M.Lundin, S.Nordling, J.Lundin, H.Alfthan, U.-H.Stenman und C.Hagund,
Int.J.Cancer, **95** (2001) 18-22
- (12) K.Hotakainen, B.Ljungberg, A.Paju, T.Rasmuson, H.Halthan und
U.-H.Stenman, *Brit.J.Cancer*, **86** (2001) 185-189
- (13) D.S.Hoon, T.Sarantou, F.Doi, D.D.Chi, C.Kuo, A.J.Conrad, P.Schmid,
R.Turner und A.Guilliano, *Int.J.Cancer*, **69** (1996) 369-374
- (14) M.Bo und I.J.Boime, *J.Biol.Chem.*, **267** (1992) 3179-3184
- (15) K.Talmadge, N.C.Vamvakopoulos und J.C.Fiddes, *Nature*,
307 1984) 37-40
- (16) P.Policastro, C.Ovitt, M.Hoshina, H.Fukuoka, M.R.Boothby und I.Boime,
J.Biol.Chem., **258** (1983) b11492-11499
- (17) D.Bellet, V.Lazar, I.Bieche, V.Paradis, Y.Giovangrandi, P.Paterlini,
R.Lidereau, P.Bedossa, J.-M.Bidart und M.Vidaut, *Cancer Res.*,
57 (1997) 516-523
- (18) P.K.Hotakainen, E.M.Serlachius, S.I.Lintula, H.V.Halfthan, J.P.Schröder
und U.-H.E.Stenman, *Mol.Cell.Endocrinol.*, **162** (2000) 79-85
- (19) A.K.Miller-Lindholm, C.J.Labenz, J.Ramey, E.Bedow und R.Ruddon,
Endocrinology, **138** (1997) 5459-5465
- (20) S.Madersbacher, C.Kratzik, R.Gerth, S.Dirnhofer und P.Berger, *Cancer Res.*,
54 (1994) 5096-5100
- (21) R.Oyasu, L.Nan, P.Smith und H.Kawamata, *Arch.Pathol.Lab.Med.*,
119 (1994) 715-717

Sequenzprotokoll

SEQ ID NO 1

<110> Universität Leipzig

<120> Verwendung des Gens $\beta 6$ und/oder $\beta 7$ der β -Untereinheit von hCG als Marker zur Implantationsdiagnostik

<130>

<160> 7

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> β hCG gesamt

<221>

<301> Lindholm-Miller, A.K., Labenz, C.J., Ramey, J., Bedows, E., Ruddon, R.W.,

<302> Human Chorionic Gonadotropin- β -Gene Expression in First Trimester Placenta

<303> Endocrinology 138 (1997) 5459-5465

<304> 138

<305> 12

<306> 5459-5465

<307>

<400> 1

tcacttcacc gtggtctcc (Primer 1, β hCG gesamt)

1 10 19

16

SEQ ID NO 2

<110> Universität Leipzig

<120> Verwendung des Gens $\beta 6$ und/oder $\beta 7$ der β -Untereinheit von hCG als
Marker zur Implantationsdiagnostik

<130>

<160> 7

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> β hCG gesamt

<221>

<301> Lindholm-Miller, A.K., Labenz, C.J., Ramey, J., Bedows, E., Ruddon,
R.W.,

<302> Human Chorionic Gonadotropin- β -Gene Expression in First Trimester
Placenta

<303> Endocrinology 138 (1997) 5459-5465

<304> 138

<305> 12

<306> 5459-5465

<307>

<400> 2

NED - tgcagcacgc gggtcatggt

(Primer 2, β hCG gesamt)

tgcagcacgc gggtcatggt

1

10

20

<110> Universität Leipzig

<120> Verwendung des Gens $\beta 6$ und/oder $\beta 7$ der β -Untereinheit von hCG als Marker zur Implantationsdiagnostik

<130> trophoblastäres hCG $\beta 5$, $\beta 8$, $\beta 3$

<160> 7

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> β hCG $\beta 5$, $\beta 8$, $\beta 3$

<221>

<400> 3

HEX - ggaccagtca gaggagaggg

(Primer 3, β hCG $\beta 5$, $\beta 8$, $\beta 3$)

ggaccagtca gaggagaggg

1

10

20

SEQ ID NO 4

17

18

- <110> Universität Leipzig
- <120> Verwendung des Gens $\beta 6$ und/oder $\beta 7$ der β -Untereinheit von hCG als Marker zur Implantationsdiagnostik
- <130> endometriales hCG $\beta 7$, $\beta 6$, $\beta 6e$
- <160> 7
- <210> 4
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> β hCG $\beta 7$, $\beta 6$, $\beta 6e$
- <221>
- <400> 4

6FAM - agaccactga ggggagagga (Primer 4, β hCG $\beta 7$, $\beta 6$, $\beta 6e$)
agaccactga ggggagagga
1 10 20

<110> Universität Leipzig
 <120> Verwendung des Gens $\beta 6$ und/oder $\beta 7$ der β -Untereinheit von hCG als
 Marker zur Implantationsdiagnostik

<130>

<160> 7

<210> 5

<211> 841

<212> DNA

<213> β hCG $\beta 7$

<221>

<301>

<302>

<303>

<304>

<305>

<306>

<307>

<308>

<400> 5

(β hCG $\beta 7$, Sequenz des Gens im Endometrium)

agcactttcc	tcgggtcacg	gcctcctcct	ggttcccaag	accccaaccat	aggcagaggg	60
aggccttcct	acaccctact	ctctgtgcct	ccagcctcga	ctagtcccta	gcactcgacg	120
actgagtctc	agaggtcact	tcacogtgg	ctccgcctca	tccttggcgc	tagaccactg	180
aggggagagg	actgggggtg	tcggtgagc	cactcctgtg	cctccctggc	cttgtctact	240
tctcgccccc	cgaagggtta	gtgtccagct	cactccagca	tcctacaacc	tcctgggtggc	300
cttgacgccc	ccacaaaccc	gagggtataa	gccaggtaca	ccaggcaggg	gacgcaccaa	360
ggatggagat	gttccagggg	ctgctgctgt	tgctgctgct	gagcatgggc	gggacatggg	420
catccaagga	gatgcttcgg	ccacgggtgc	gccccatcaa	tgccaccctg	gctgtggaga	480
aggagggtg	ccccgtgtgc	atcacogtca	acaccaccat	ctgtgccggc	tactgcccc	540
ccatgaccgg	cgtgctgcag	ggggctcctg	cggccctgcc	tcaggtggtg	tgcaactacc	600
gcgatgtgcg	cttcgagtcc	atccggctcc	ctggctgccc	gcggggcggtg	aaccccggtg	660
tctcctacgc	cgtggctctc	agctgtcaat	gtgcactctg	ccgccgcagc	accactgact	720
gcgggggtcc	caaggaccac	cccttgacct	gtgatgaccc	ccgcttcacg	gcctcctctt	780
cctcaaaggc	ccctccccc	agccttccaa	gtccatccc	actcccgggg	ccctcggaca	840
ccccgatcct	cccacaataa	a				861

<110> Universität Leipzig

<120> Verwendung des Gens $\beta 6$ und/oder $\beta 7$ der β -Untereinheit von hCG als
Marker zur Implantationsdiagnostik

<130>

<160> 7

<210> 6

<211> 861

<212> DNA

<213> β hCG $\beta 6$

<221>

<301>

<302>

<303>

<304>

<305>

<306>

<307>

<308>

<400> 6 (β hCG $\beta 6$, Sequenz des Gens im Endometrium)

agcactttcc	tcgggtcacg	gcctcctcct	ggttcccaag	acccaccat	aggcagaggg	60
aggccttct	acaccctact	ctctgtgcct	ccagcctcga	ctagtcccta	acactcgacg	120
actgagtctc	agaggtcact	tcaccgtggg	ctccgcctca	tccttggcgc	tagaccactg	180
aggggagagg	actgggggtgc	tccgctgagc	cactcctgtg	cctccctggc	cttgtctact	240
tctogccccc	cgaagggtta	gtgtcgagct	cactccagca	tcctacaacc	tcctgggtggc	300
cttgccgccc	ccacaacccc	gaggtatgaa	gccaggtaca	ccaggcaggg	gacgcaccaa	360
ggatggagat	gttccagggg	ctgctgctgt	tgctgctgct	gagcatgggc	gggacatggg	420
catccaagga	gccacttcgg	ccacgggtgc	gccccatcaa	tgccaccctg	gctgtggaga	480
aggagggctg	ccccgtgtgc	atcacccgtca	acaccaccat	ctgtgccggc	tactgccccca	540
ccatgaccog	cgtgetgcag	ggggtcctgc	cggccctgcc	tcagggtggtg	tgcaactacc	600
gcgatgtgog	cttcgagtcc	atccggctcc	ctggctgccc	gcgcggcggtg	aaccccggtgg	660
tctcctacgc	cgtggctctc	agctgtcaat	gtgcactctg	ccgcgcgacg	accactgact	720
gcgggggtcc	caaggaccac	cccttgacct	gtgatgacct	ccgcttccag	gcctcctctt	780
cctcaaaggc	ccctccccc	agccttccaa	gtccatcccg	actccggggg	ccctcggaca	840
ccccgatcct	cccacaataa	a				861

SEQ ID No 7

<110> Universität Leipzig

<120> Verwendung des Gens $\beta 6$ und/oder $\beta 7$ der β -Untereinheit von hCG als Marker zur Implantationsdiagnostik

<130>

<160> 7

<210> 7

<211> 861

<212> DNA

<213> β hCG $\beta 6e$ (e Endo, Endometrium)

<221>

<301>

<302>

<303>

<304>

<305>

<306>

<307>

<308>

<400> 7 (β hCG $\beta 6e$, Sequenz des Gens im Endometrium)

agcactttcc	tcgggtcagc	gcctcctcct	ggttcccaag	accccacccat	aggcagaggc	60
aggccttcc	acaccctact	ctctgtgcct	ccagcctcga	ctagtcccta	gcactcgacg	120
actgagtctc	agaggtcact	tcaccgtggt	ctcgcctca	tccttggcgc	tagaccactg	180
aggggagagg	actggggtgc	tccgctgagc	cactcctgtg	cctccctggc	cttgtctact	240
tctcgcccc	cgaagggtta	gtgtccagct	cactccagca	tcctacaacc	tcctgggtggc	300
cttgccgccc	ccacaaaccc	gaggtataaa	gccagggtaca	ccaggcaggg	gaögcaccaa	360
ggatggagat	gttcöagggg	ctgctgctgt	tgctgctgct	gagcatgggc	gggacatggg	420
catccaagga	gatgottcgg	ccacgggtgc	gccccatcaa	tgccaccctg	gctgtggaga	480
aggagggtg	ccccgtgtgc	atcacccgtca	acaccaacat	ctgtgccggc	tactgccccca	540
ccatgaccgc	cgtgctgcag	gggtcctgc	cggccctgce	tcagggtggtg	tgcaactacc	600
gcgatgtgcg	cttcgagtcc	atccggctcc	ctggtgcgcc	gcgcggcgtg	aaccccggtg	660
tctcctacgc	cgtggctctc	agctgtcaat	gtgcactctg	ccgcgcgagc	accactgact	720
gcgggggtcc	caaggaccac	cccttgacct	gtgatgacct	ccgcttcacg	gcctcctctt	780
cctcaaaggc	ccctccccc	agccttccaa	gtccatcccc	actcccgggg	ccctcggaca	840
ccccgatcct	cccacaataa	a				861

Universitätsfrauenklinik der Universität Leipzig
Forschungslabor Humane Reproduktion und Endokrinologie

Transkriptionsstart β hCG

LH4
CG5
CG6
CG7
Endo

.....

CTT CAA TCC AGC ACT TTG CTC GGG TCA CGG CCT CCT CCT GGC TCC
CTT CAG TCC AGC ACT TTC CTC GGG TCA CGG CCT CCT CCT GGT TCC
CTT CAG TCC AGC ACT TTC CTC GGG TCA CGG CCT CCT CCT GGT TCC
CCT GGT TCC

-360 -330

LH4 A A T
CG5 CAG GAC CCC ACC ATA GGC AGA GGC AGG CCT TCC TAC ACC CTA CTC CCT GTG CCT CCA GGC
CG6 CAA GAC CCC ACC ATA GGC AGA GGC AGG CCT TCC TAC ACC CTA CTC TCT GTG CCT CCA GCC
CG7 CAA GAC CCC ACC ATA GGC AGA GGC AGG CCT TCC TAC ACC CTA CTC TCT GTG CCT CCA GCC
Endo CAA GAC CCC ACC ATA GGC AGA GGC AGG CCT TCC TAC ACC CTA CTC TCT GTG CCT CCA GCC

-300 -270

LH4
CG5
CG6
CG7
Endo

TCG ACT AGT CCC TAG CAC TCG ACG ACT GAG TCT CTG AGG TCA CTT CAC CGT GGT CTC CGC
TCG ACT AGT CCC TAG CAC TCG ACG ACT GAG TCT CAG AGG TCA CTT CAC CGT GGT CTC CGC
TCG ACT AGT CCC TAG CAC TCG ACG ACT GAG TCT CAG AGG TCA CTT CAC CGT GGT CTC CGC

-240 -210

LH4
CG5
CG6
CG7
Endo

CTC ACC CTT GGC GCT AGA CCA CTG AGG GGA GAG GAC TGG GGT GCT CCG CTG AGC CAC TCC
CTC ATC CTT GGC GCT AGA CCA CTG AGG GGA GAG GAC TGG GGT GCT CCG CTG AGC CAC TCC
CTC ATC CTT GGC GCT AGA CCA CTG AGG GGA GAG GAC TGG GGT GCT CCG CTG AGC CAC TCC

-180 -150

LH4
CG5
CG6
CG7
Endo

TGC GCC CCC CTG GCC TTG TCT ACC TCT TGG CCC CCG AAG GGT TAG TGT CGA GGT CAC CCC
TGT GCC TCC CTG GCC TTG TCT ACT TCT CGC CCC CCG AAG GGT TAG TGT CGA GGT CAC TCC
TGT GCC TCC CTG GCC TTG TCT ACT TCT CGC CCC CCG AAG GGT TAG TGT CCA GCT CAC TCC

-120 -90

LH4
CG5
CG6
CG7
Endo

AG- CAT CCT ACA ACC TCC TGG TGG CCT TGC CGC CCC CAC AAC CCC GAG GTA TAA AGC CAG
AG- CAT CCT ACA ACC TCC TGG TGG CCT TGC CGC CCC CAC AAC CCC GAG GTA TAA AGC CAG
AG- CAT CCT ACA ACC TCC TGG TGG CCT TGC CGC CCC CAC AAA CCC GAG GTA TAA AGC CAG

-60 -30

LH
hCG
LH4

met glu met phe gln ***** Intron *****

GTA CAC CAG GCA GGG GAC GCA CCA AGG ATG GAG ATG TTC CAG GTA AGA CTG CAG ...
GTA CAC CAG GCA GGG GAC GCA CCA AGG ATG GAG ATG TTC CAG
GTA CAC CAG GCA GGG GAC GCA CCA AGG ATG GAG ATG TTC CAG
GTA CAC CAG GCA GGG GAC GCA CCA AGG ATG GAG ATG TTC CAG

-1 +1 +15

LH
hCG *** ** gly leu leu leu leu leu leu leu ser met gly gly ala
LH4
CG5 ... TTG TCC CAG GGG CTG CTG CTG TTG CTG CTG AGC ATG GGC GGG ACA TGG GCA
CG6
CG7
Endo GGG CTG CTG CTG TTG CTG CTG CTG AGC ATG GGC GGG ACA TGG GCA
+16 +30 +60

1 4 10 20
LH arg trp his ile
hCG ser lys glu pro leu arg pro arg cys arg pro ile asn ala thr leu ala val glu lys
LH4 G CCG T A T
CG5 TCC AAG GAG CCG CTT CGG CCA CGG TGC CGC CCC ATC AAT GCC ACC CTG GCT GTG GAG AAG
CG6 A CCA C G C
CG7 A ATG C C
Endo TCC AAG GAG ATG CTT CGG CCA CGG TGC CGC CCC ATC AAT GCC ACC CTG GCT GTG GAG AAG
met +90 +120

21 30 40
LH
hCG glu gly cys pro val cys ile thr val asn thr thr ile cys ala gly tyr cys pro thr
LH4
CG5 GAG GGC TGC CCC GTG TGC ATC ACC GTC AAC ACC ACC ATC TGT GCC GGC TAC TGC CCC ACC
CG6
CG7
Endo GAG GGC TGC CCC GTG TGC ATC ACC GTC AAC ACC ACC ATC TGT GCC GGC TAC TGC CCC ACC
+150 +180

41 42
LH
hCG met *** ** Intron *** ** met
LH4
CG5 ATG GTG AGC TGC CCG GGG CCG ... CCC CAC TCA CAC GGC TTC CAG ACC
CG6
CG7
Endo ATG
+183 +186

50 60
LH
hCG arg val leu gln gly val leu pro pro ala leu pro gln val val cys thr
LH4 C C C
CG5 ~~CGG GGC GTC CTG CCG~~ GGC CTG CCT CAG GTG GTG TGC AAC TAC CGC GAT GTG
CG6 G G G
CG7 G A A
Endo CGC GTG CTG CAG GGC GTC CTG CCG GCC CTG CCT CAG GTG GTG TGC AAC TAC CGC GAT GTG
+210 +240

70 80
LH
hCG arg phe glu ser ile arg leu pro gly cys pro arg gly val asp phe
LH4 T G T
CG5 CGC TTC GAG TCC ATC CGG CTC CCT GGC TGC CCG CGC GGC GTG AAC CCC GTG GTC TCC TAC
CG6 C A A
CG7 C A A
Endo CGC TTC GAG TCC ATC CGG CTC CCT GGC TGC CCG CGC GGC GTG AAC CCC GTG GTC TCC TAC
+270 +300

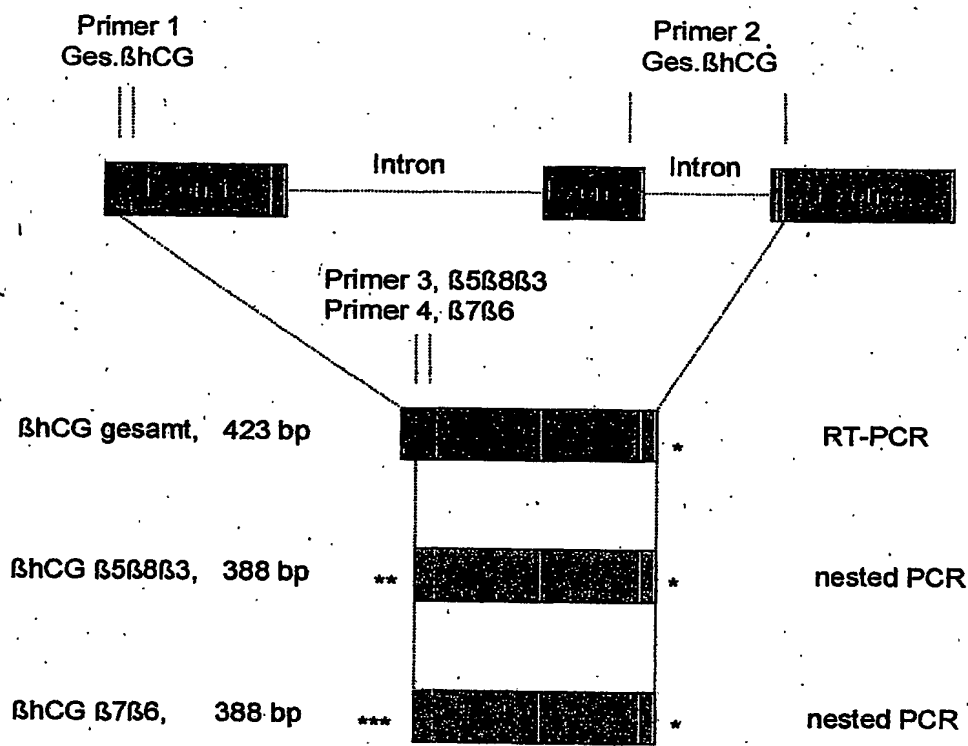
[illegible]

	130	140
hCG	ala pro pro pro ser leu pro ser pro ser arg leu pro gly pro ser asp thr pro ile	
LH4	A	
CG5	GCC CCT CCC CCC AGC CTT CCA AGT CCA TCC CGA CTC CCG GGG CCC TCG GAC ACC CCG ATC	
CG6	C	
CG7	C	
Endo	GCC CCT CCC CCC AGC CTT CCA AGT CCA TCC CGA CTC CCG GGG CCC TCG GAC ACC CCG ATC	
	+450	+480

145

hCG	leu	pro	gln	ter
LH4				
CG5	CTC	CCA	CAA	TAAA
CG6				
CG7				
Endo	CTC	CCA	CAA	

+495



Fluoreszenzmarker: * NED, ** HEX, ***6-FAM

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.